

アレルギー性接触皮膚炎の成立機序に関する 実験的研究：抗原の形成と認識について

川崎医科大学 皮膚科
岡 大 介
(昭和59年2月10日受付)

Experimental Studies on the Mechanism of Allergic Contact Dermatitis: Formation and Recognition of Antigen

Daisuke Oka
Department of Dermatology
Kawasaki Medical School
(Accepted on February 10, 1984)

JY-1 近交系モルモットの耳介に5% DNCB エタノール溶液を塗布し、3時間後に採取した皮膚にトリプシンを作用させて得た浮遊表皮細胞(DNP-EC)に抗DNP抗体を用いた蛍光抗体法を施行した結果、平均91.7%の細胞にDNP基が証明され、DNP基が分布する細胞の1部はIaを有する細胞(ランゲルハンス細胞)であった。角化細胞ではDNP基は細胞表面にヒマン性に分布することが免疫走査電顕法、酵素抗体法により観察された。

DNP-ECを正常JY-1モルモットの耳介に 5×10^6 コ以上皮内注射するとDNCBに対するアレルギー性接触皮膚炎の感作が成立し、DNP-ECを超音波で破壊しても感作能力は変わらなかった。更にそれを 56°C 30分間加熱しても感作は変わらず成立したが、凍結・融解を繰り返すと感作率は著しく低下した。

DNP-ECの投与の前後3日以内に注射部位の皮膚をtape strippingすると感作率は著しく低下したが、tape strippingと同時にDNP-ECを注射する際、正常表皮細胞(EC)を 1×10^7 コ以上あるいは腹腔マクロファージ 5×10^6 コを加えることにより、tape strippingの影響は消失し感作の成立は回復した。またtape strippingにより感作が成立しなかった動物にDNCBを塗布して再感作を試みたが免疫学的不応(トレランス)の状態になっていた。トレランスの誘導はDNP-ECにECを 3×10^6 コ加えると抑制された。

以上の成績から、皮膚に接触したハプテンは角化細胞、ランゲルハンス細胞の主として細胞膜成分に結合し、このようにして形成された抗原を表皮ランゲルハンス細胞が貪食、消化、提示し、これを免疫担当細胞が認識することによりアレルギー性接触皮膚炎の感作は成立する。ランゲルハンス細胞の関与がない場合にはトレランスが誘導されると考えられる。

Single epidermal cells prepared from the ear skin of inbred JY-1 strain guinea pigs 3 hours after painting with 5% DNCB ethanol solution were examined by either immunofluorescent and peroxidase-conjugated antibody techniques or by the

scanning immunoelectron microscopic method using anti DNP or anti Ia antigen antibodies. DNP groups were demonstrated on 91.7% of the epidermal cells (DNP-EC) both keratinocytes and Ia positive cells (Langerhans cells) on the average. Electron microscopic studies showed that they were distributed on the surface of keratinocytes.

Contact sensitization to DNCB was achieved by intradermal injection of more than 5×10^6 DNP-EC killed by sonication or heating as well as by live cells in recipient animals. The sensitizing ability of the cells disappeared after freeze-thawing.

The induction of contact sensitivity to DNCB was clearly impaired if DNP-EC was presented through skin stripped by cellophane tape within 3 days before and after the antigen application. Such animals were unable subsequently to become specifically sensitized when immunization was attempted by DNCB painting through normal skin. The ability to induce contact sensitivity returned to the pretreatment (normal) state if DNP-EC was injected with more than 1×10^7 normal epidermal cells or 3×10^6 peritoneal macrophages.

It is suggested that contact allergens penetrate through skin and combine with the cell membrane of keratinocytes and Langerhans cells in the epidermis, and that the resulting modified cells act as immunogens or tolerogens in contact sensitivity to the allergens. We also concluded that not only are Langerhans cells essential as antigen-presenting cells for induction of contact sensitivity, but also that their absence leads to specific unresponsiveness.

Key Words ① Contact sensitivity ② Antigen distribution ③ DNCB

はじめに

接触皮膚炎はもっとも頻度の高い皮膚疾患の1つであり、外界から原因物質が皮膚に触れて生ずる表皮を中心とした炎症である。そしてそれは発生機序により一次刺激性 (primary irritant contact dermatitis) とアレルギー性 (allergic contact dermatitis, contact sensitivity) に大別され、古くからそのメカニズムが研究されてきた。接触皮膚炎のアレルギー機序は、抗原形成、その認識、感作の成立、調節機構の誘導、反応の惹起などの過程に区分することができるが、今回の我々の検討の対象は前2者である。

アレルギー性接触皮膚炎の原因物質の多くは、比較的分子量が低く、構造の簡単な免疫学的には不完全抗原 (ハプテン) と呼ばれるもので、この様な物質が抗原としてアレルギーを起こす能力を獲得するには、蛋白のような高分子

の物質 (担体) と結合することが必要である。経皮的 (塗布もしくは皮内注射) にハプテンが投与された動物では容易にアレルギー性接触皮膚炎の感作が成立するのに反し、皮下、腹腔内、リンパ節内、静脈内など皮膚に直接接触することなくハプテンが投与された場合には、感作が全く成立しないか、あるいはしても弱いことが知られており^{1),2)}、このことより表皮細胞の構成成分が感作に有効な担体と考えられてきた。またハプテンは皮膚表面に接触すると表皮細胞成分と容易に結合することが証明されている³⁾。しかしながら表皮細胞のどのような成分にハプテンが結合してアレルギー性接触皮膚炎の抗原となるかという重要な問題は明らかにされていない。この点を解明する目的で我々は経皮的に投与されたハプテンの皮膚内分布のより詳細な観察を試みた。

続いて問題となるのはこのようにして形成された抗原がどのようにして免疫担当細胞に認識

されて感作が成立するかということである。近年角化細胞、色素細胞と並んで表皮構成細胞の1つであるランゲルハンス細胞はマクロファージと同様の性質、機能をもつことが明らかになり^{4),5)}、アレルギー性接触皮膚炎におけるその役割が注目されている。本来ランゲルハンス細胞の数が少ないマウスの尾部や紫外線などで人為的に同細胞に障害を与えた皮膚にハプテンを経皮的に投与すると感作が成立しないことが報告され、同細胞が感作過程で重要な役割を果たしていることが推測されている^{6),7)}。しかし詳細は明らかでなく多くの研究者により研究が進められている。我々は皮膚を tape stripping してランゲルハンス細胞に障害を与え、同部に抗原を加えることにより感作成立に対する影響を観察した。そして抗原認識における同細胞の役割を検討した。

実験材料及び方法

1) 実験動物: 近交系 JY-1 モルモットは紀和実験動物研究所より、Strain 2 と 13 系モルモットは日本生物科学研究所より入手し、いずれも雄性、体重 250 g—350 g を使用した。

2) 2, 4-dinitrophenyl (DNP) 抗体の作製: 抗 DNP 血清は Nakagawa ら⁸⁾ の方法で作製した。すなわち、家兎の足蹠および背に Freund's complete adjuvant (Difco, FCA) 加 DNP-OVA 8.4 mg を 3 回、1 週間間隔で皮下注射し、さらに DNP-OVA 4.2 mg を 1 週間に 1 回の割合で 2 回背部に皮下注射して感作した。最後の注射から 2 週間後、DNP-OVA 1 mg/0.5 ml PBS (0.01M phosphate buffer saline, pH 7.2) を抗ヒスタミン剤投与後静注した。抗 DNP 血清はさらに Eisen ら⁹⁾ の方法に従って immunoabsorbent 法で抗 DNP 抗体のみを採取した。すなわち、抗血清を PBS にて 2 倍希釈し、DNP-BSA を最適比となるように加え、37°C 1 時間、更に 4°C で 24 時間反応させた。できた沈澱物を 4000 rpm, 4°C, 20 分間遠心して集め 0.15M 冷生食水で 3 回洗浄後、0.1M 2, 4-dinitrophenol (0.15 M NaCl-0.01 M K-phosphate, pH 7.58, 以下 K-buffer に溶解)

50 ml に溶解し、37°C 1 時間、更に 4°C 24 時間静止した。4000 rpm, 4°C, 20 分間遠心後、上清をとり、2 重層イオン交換樹脂カラムを通した。下層は DoweX1 (×8, 200—400 mesh, Dowechemical) 4.5×23.2 cm, 上層は DEAE cellulose (Brown) 4.5×8.1 cm でいずれも K-buffer で平衡化しておく。流速は 3 ml/min, 温度は 41°C で行った。カラムに可溶性抗体・ハプテン complex をかける前に 0.1M 2, 4-dinitrophenol を 50 cc 加えておき、また抗体・ハプテン complex をかけた後も等量の 0.1M dinitrophenol を加え、その後 K-buffer を流した。得られた分画は抗ウサギ IgG ヤギ血清および DNP-OVA, DNP-BSA を用いた免疫電気泳動法により、DNP 基に対する抗体活性をもつウサギ IgG 分画であることを確認した。

3) Ia 抗体 (抗 Ia 1, 3, 7) の作製: Geczy ら⁹⁾ の方法に若干の変更を加えて作製した。すなわち、Strain 13 モルモットの腋窩部、鼠径部、腸間膜リンパ節および脾臓を取り出し、RPMI 1640 (Nissui) 溶液中で細胞ケン濁液を調製した。150 メッシュのステンレスワイヤーメッシュで濾過後、1500 rpm, 4°C 5 分間遠心して細胞を集めた。初回免疫は FCA でエマルジョンした 5×10^8 リンパ節および脾細胞を足蹠および背に皮下注射した。初回免疫の 2, 3, 4, 5, 6 週後に RPMI 1640 にケン濁した $1 \sim 5 \times 10^8$ リンパ節および脾細胞で追加免疫した。最終免疫 10 日後に心臓穿刺にて全採血を行った。血清分離後、-70°C にて保存した。尚、使用前に 56°C 30 分間非動化して用いた。

4) 遊離表皮細胞の調製: 5% DNCB エタノール溶液 0.2 ml を正常 JY-1 モルモットの耳介に塗布し、10 分後あるいは 3 時間後に同部を切除した。また未処理の耳介も採取し、それぞれから表皮細胞浮遊液を Steinmuller & Wanderlich ら¹⁰⁾ の方法に若干の変更を加えて調製した。耳介は軟骨部にて皮膚を剝離し、十分に皮下組織を取りのぞいた後、0.5% トリプシン (Difco, 1:250, PBS に溶解) にて 37°C, 1 時間浸漬し、表皮を真皮から分離して、0.025%

crude DNase I (Sigma, PBS に溶解) のもとで遊離し, 10% FCS 加 minimal essential medium (MEM) で1回洗浄後, 更に PBS で2回洗浄して使用した. 3時間前に DNCB を塗布した皮膚からの遊離表皮細胞の1部は $5 \times 10^6/0.2$ ml PBS に調製した後, 超音波にて生残率が0%になるまで破壊した. その後, 56°C 30分間加熱あるいは -70°C 室温での凍結・融解3回の処理を加えた. 尚, 生残率は trypan blue exclusion法にて調べた.

5) ベトリ皿付着腹腔滲出細胞 (PEC-Add) の調製: 正常 JY-1 モルモット腹腔に 20 ml の流動パラフィンを注射し, 3日後ヘパリン加 PBS (5000U ヘパリン/250 ml PBS) にて腹腔滲出細胞を回収した. これを PBS にて3回洗浄し, その後 $5 \times 10^6/\text{ml}$ に10% FCS 加 MEM にて調製し, その浮遊液 3 ml を特殊コーティングプレート (MSP, JIMRO) に加えて1時間 37°C , 5% CO_2 下で反応させ, 非付着細胞を洗い流した後, ベトリ皿を 4°C 30分間冷却し, ラバーポリスマンを用いて付着細胞を回収した.

6) 蛍光抗体法: 3時間前に DNCB を塗布した皮膚より得られた DNP-EC をプレパラート上で風乾し, 95% エタノール溶液で固定した. PBS で洗浄後, 10% 正常家兎血清で 37°C 30分反応させた後, FITC 標識抗 DNP 抗体 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 37°C , 1時間反応させ, PBS にて洗浄後, グリセリン・PBS にて封入し, Nikon-Fluophoto (uv 330—380 nm, フィルター-410W) で観察し, 写真撮影した. 1000個以上の細胞を観察し, DNP-陽性細胞率を調べた. コントロールの為, 非標識抗体法および特異抗原による blocking test を行った.

7) Ia 陽性細胞の確認とそれにおける DNP 基の証明: 10分前に DNCB を塗布した皮膚より得られた DNP-EC をプレパラート上で風乾後, 95% エタノール溶液で固定した. PBS で洗浄後, 10倍希釈抗 Ia 血清で 37°C 30分間反応させた. PBS にて洗浄後, FITC 標識抗モルモット IgG (MBL) で 37°C , 30分間反応させ, 再び PBS にて洗浄後, グリセリン・PBS に封

入し, Nikon-Fluophoto で観察し, 写真撮影した. その後, PBS にて洗浄し, ペルオキシダーゼ標識抗 DNP 抗体 (MBL 社にてペルオキシダーゼ標識, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 37°C , 30分間反応させ PBS にて洗浄後, 3, 3' DAB- H_2O_2 反応液 (0.1% 3, 3'-diaminobenzidine, 0.05M トリス塩酸緩衝液 pH 7.6 に溶解, 0.003% 過酸化水素) にて15分間, 室温にて反応させた. PBS にて洗浄後, 型どおり脱水し封入した.

8) 免疫走査電顕法: DNP-EC 浮遊液 ($1 \times 10^7/\text{ml}$) を poly-L-Lysine で処理したカバーガラスの表面に1滴のせ, 室温で30分間反応させた. これにて DNP-EC はカバーガラスの表面に均一に付着する. 1% グルタルアルデヒド (GA) で10分間前固定後, 0.15M グリシンで処理した. PBS にて3回洗浄後, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 DNP 抗体で 37°C , 20分間反応させ PBS で再び洗浄した. 更に 37°C で30分間, T_4 phage 標識抗ウサギ IgG ($0.5 \text{mg}/\text{ml}$, 公文裕巳先生より供与) と反応させ PBS 洗浄後, 2% GA で 4°C 1時間, 1% オスミウム酸 4°C 1時間で2重固定し, 型のごとくエタノール脱水, 醋酸アルミ処理後臨界点乾燥を行いゴールド・パラディウム蒸着後 HB-2K 走査電子顕微鏡 (Hitachi Ltd.) にて観察した. 尚, コントロールの為非標識抗体法および特異抗原による blocking test を行った.

9) 酵素抗体法: DNP-EC を抗 DNP 抗体 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 37°C , 30分間反応させ PBS で洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (MBL) と 37°C , 30分間反応させた. PBS で洗浄後, 2.5% GA で1時間固定した. PBS にて洗浄後, 3-3 DAB- H_2O_2 反応液で15分間, 室温で反応させた. さらに PBS で洗浄後, 2% オスミウム酸で1時間固定した. 型どおりエタノール脱水し, エポン包埋した. 超薄切片作製後, H-500 電子顕微鏡 (Hitachi Ltd.) にて観察した. 尚, コントロールの為非標識抗体法および特異抗原による blocking test を行った.

10) tape stripping による recipient 耳介の処理: JY-1 モルモット両耳介にセロテープ

を平均 20 回貼布・剝離を繰り返した。この回数で、表面が光沢をおびるのに十分であった。

11) DNCB アレルギー性皮膚炎の感作と判定: JY-1 モルモットの正常あるいは tape stripping した耳介に, DNP-EC, 処理 DNP-EC, DNP-EC+PEC (Add), DNP-EC+EC を 0.2 ml PBS に浮遊させ皮内注射した。14 日後, 剃毛した側腹部に 0.1%, 0.05%, 0.025% DNCB エタノール溶液 0.01 ml を直径約 1 cm の円内に塗布し, 24 時間後 Frey ら¹¹⁾ の行った判定基準に従って 4 段階に分類し, 各段階に一定の数値を付して表現した。すなわち, 0: 反応なし, 0.5: 塗布部に部分的紅斑, 1: びまん性の軽度の紅斑, 2: 著明な紅斑に軽度の浮腫, 3: 著明な紅斑と高度の浮腫の 4 段階である。さらに各動物の被感作の強さも Frey ら¹²⁾ に従って上述の各濃度の強さの数字を合計して表現した。

12) 免疫学的不応の誘導と判定: 感作 15 日後, 5% DNCB エタノール溶液 0.02 ml を項部に塗布して再感作した。1 週間後, 剃毛した側腹部に 0.1%, 0.05%, 0.025% DNCB エタノール溶液を直径 1 cm の円内に塗布し, 24 時間後に Frey^{11), 12)} らの方法に準じて判定した。

結 果

表皮細胞における DNP 基の分布: 5% DNCB エタノール溶液 0.2 ml を JY-1 モルモット耳介皮膚に塗布し, 3 時間後に耳介を切除, トリプシンで処理して表皮細胞浮遊液を作製し, これに FITC 標識抗体を反応させて表皮細胞における DNP 基の分布を蛍光顕微鏡で観察した。蛍光は表皮細胞の膜および胞体に一致して証明され, 核にはみられなかった (Fig. 1 の a)。DNP 基が証明される細胞は平均 91.7% に達し, 表皮細胞の生残率は 80.3% であった。更に表皮細胞表面に DNP 基が分布するかどうかを検討する目的で T₄ バクテリオファージをマーカーとした免疫走査電顕法 (間接法) で観察した。T₄ バクテリオファージは表皮細胞の表面にビマン性に分布していた (Fig. 1 の b の

顆粒)。また DNP 基が分布する表皮細胞の種類を確認するためにペルオキシダーゼをマーカーとする酵素抗体電顕法 (間接法) を施行した。角化細胞膜表面にペルオキシダーゼ反応物

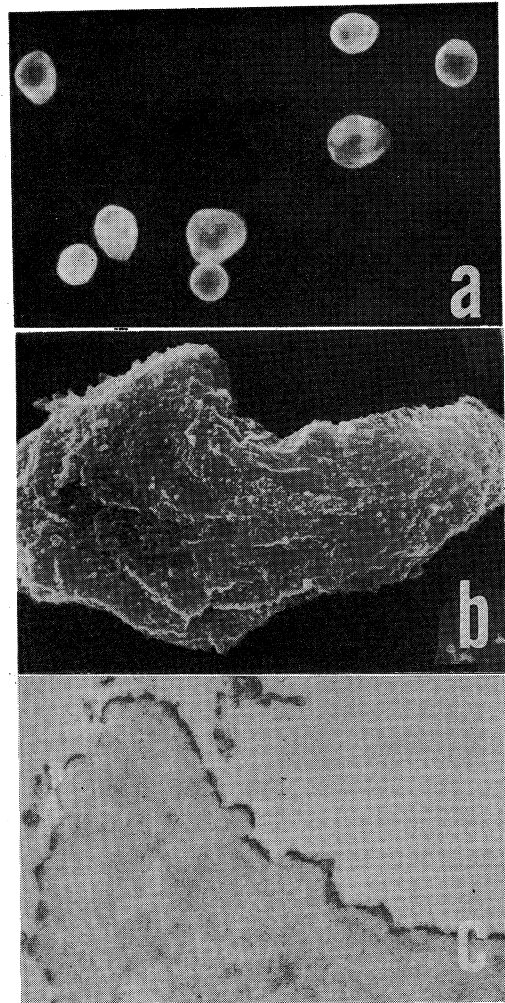


Fig. 1. Single cells prepared from guinea pig ear skin 3 hours after painting with 5% DNCB ethanol solution (DNP-EC) and followed by treated with FITC labelled anti-DNP. Fluorescein is seen in homogenous or peripheral patterns (a). Scanning electron micrograph of DNP-EC, followed by treated with anti-DNP (rabbit IgG) and T₄-anti-rabbit IgG. T₄-anti-IgG are distributed diffusely over the cell surface (b). Transmission electron micrograph of DNP-EC, followed by treated with anti-DNP (rabbit IgG) and peroxidase labelled anti-rabbit IgG. Continuous reaction products are found on the surface of keratinocyte (c).

が証明された (Fig. 1 の c). ランゲルハンス細胞における DNP 基の分布の証明は成功しなかった.

ランゲルハンス細胞に DNP 基が分布するか

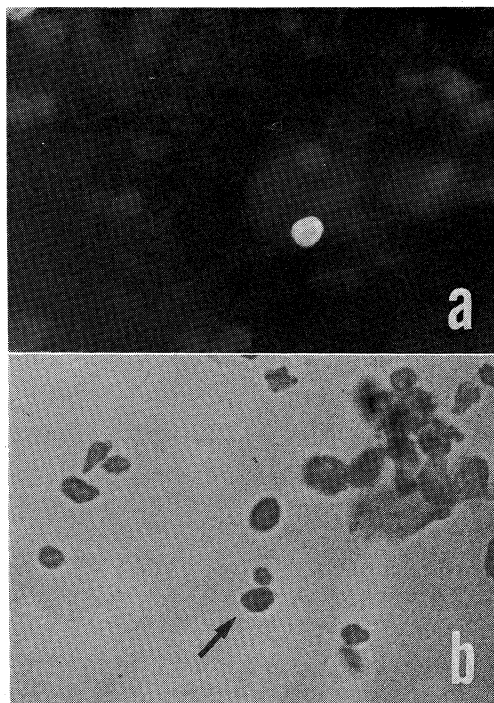


Fig. 2. Single cells prepared from guinea pig ear skin 10 minutes after painting with 5% DNCB ethanol solution and followed by treated with anti Ia serum (guinea pig) and FITC labelled anti-guinea pig IgG. Fluorescein is seen in one of the cells (a). The fluorescent cell is also positively labelled with peroxidase conjugated anti-DNP antibody (b, arrow).

否かを検討する目的で, 10分前に DNCB 塗布した皮膚から作製した浮遊表皮細胞に抗 Ia 抗体を用いた蛍光抗体間接法を行い, 陽性細胞を写真撮影した後にペルオキシダーゼ標識抗 DNP 抗体を反応させて DNP 基の分布を観察した. その結果 Ia 抗原陽性細胞 (Fig. 2 の a) に DNP 基の分布が証明された (Fig. 2 の b).

DNP-EC による感作実験 (Table 1): 次に上記の実験により DNCB が結合している表皮細胞によりアレルギー性接触皮膚炎の感作が成立するか否かを検討した. 3×10^7 から 1×10^6 コの種々の数の DNP-EC を同系正常モルモットの耳介皮膚に皮内注射し, 2週間後に側腹部に 0.1, 0.05, 0.025% DNCB エタノール溶液を塗布して惹起試験を行った. そして24時間後の反応を観察しその強さを数量化して各濃度の反応の強さを合計して強さとした. 5×10^6 コ以上の DNP-EC の注射によりかなりの感作の成立がみられた. DNP-EC を超音波により破壊しても感作能力に変わらず, 超音波に加えて 56°C , 30分間加熱しても感作は変わらず成立したが, 凍結・融解を繰り返す処置により感作能力は著しく低下した.

DNP-EC による感作に対する tape stripping の影響 (Table 2): tape stripping により表皮ランゲルハンス細胞に障害を与え, ランゲルハンス細胞のアレルギー性接触皮膚炎の感作成立における役割を検討した. JY-1 モルモットの耳介皮膚を tape stripping し, 同時に同部へ DNP-EC 5×10^6 を皮内注射すると感作

Table 1. Induction of contact sensitivity to DNCB with epidermal cells obtained from DNCB painted guinea pig skin (DNP-EC)

Doner cells	Patch test	
	Mean intensity	Positive
DNP-EC 3×10^7 None	0.8	7/8
" 1×10^7 "	1.1	5/5
" 5×10^6 "	1.1	8/8
" 1×10^6 "	0.2	2/5
DNP-EC 5×10^6 Sonication	1.1	7/8
" " " +Heating	1.2	6/6
" " " +Freezing & Thawing	0.2	3/11

Table 2. Inhibition of DNP-EC induced contact sensitivity to DNCB by tape stripping and its recovery by adding EC and PEC to DNP-EC

Doner cells	Treatment of recipient	Patch test	
		Mean intensity	Positive
DNP-EC 5×10^6	None	1.1	7/7
DNP-EC 5×10^6	Stripping (-7d)	1.0	6/7
" "	" (-3d)	0.2	2/7
" "	" (0d)	0.3	2/7
" "	" (+3d)	0.5	6/7
" "	" (+7d)	1.1	7/7
DNP-EC 5×10^6 + EC 3×10^7	Stripping (0d)	1.2	7/7
" " + " 1×10^7	" (")	1.0	6/7
" " + " 3×10^6	" (")	0.3	5/7
" " + " 3×10^5	" (")	0.3	3/6
DNP-EC 5×10^6 + PEC 5×10^6 (adherent)	Stripping (0d)	1.0	6/7
" " + " 5×10^4 (")	" (")	0.3	4/7

Table 3. Production of tolerance in contact sensitivity to DNCB by tape stripping and its inhibition by adding EC

Doner cells	Treatment of recipient	Resensitized with	Patch test	
			Mean intensity	Positive
None	None	DNCB	1.7	7/7
DNP-EC 5×10^6	Stripping (-3d)	DNCB	1.4	7/7
" "	" (0d)	"	0.4	4/7
" "	" (+3d)	"	0.7	4/6
DNP-EC 5×10^6 + EC 3×10^6	Stripping (0d)	DNCB	2.0	7/7
" " + " 3×10^5	" (")	"	0.2	3/6

能力は、対照の tape stripping しない動物群に比べ明らかに低下し、DNP-EC の投与の前後3日目に tape stripping した場合にも同じ効果であったが、前後7日目に stripping すると対照と差はなかった。tape stripping しても DNP-EC に 1×10^7 以上の正常表皮細胞 (EC) あるいは 5×10^6 以上の腹腔マクロファージを加えて注射すると感作は十分成立するようになった。

トレランス誘導の検討 (Table 3): tape stripping により感作が十分成立しない動物に惹起反応を観察すると同時に 5% DNCB エタノール溶液 0.02 ml を項部に塗布し、1週間後に惹起試験を再度行ってトレランス誘導の有

無を検討した。DNP-EC 注射3日前に tape stripping を加えた動物群において2回目の惹起反応は対照の正常動物に DNCB を塗布して感作した場合と同程度であったが、同時あるいは3日後に tape stripping した動物群は明らかに弱く、トレランスが誘導された。トレランスの誘導は DNP-EC に EC を 3×10^6 加えた動物群ではみられなかったが、EC を 3×10^5 加えた動物群においてはトレランスは誘導された。

か ん が え

アレルギー性接触皮膚炎の原因物質であるハプテンが感作能力をもつには、蛋白質のような

高分子物質と化学的に結合(共有結合)して完全抗原となることが必要と考えられている¹³⁾。ハプテンを皮膚に塗布すると容易に感作が成立することから、ハプテンは皮膚蛋白に結合して抗原性を獲得すると考えられ、塗布されたハプテンが皮膚のどのような成分と結合するかが研究の対象となってきた。Eisenら¹⁴⁾は、DNCBをモルモットに塗布し、24時間後にはその5%が皮膚から検出され、その半分は皮膚成分と結合しており、結合したDNCBの99%は表皮成分と結合していることを報告している。また西岡ら¹⁵⁾は、DNCBをモルモット皮膚に塗布し表皮をホモジナイズして超遠心で分画すると、全分画にDNCBは証明されるが、ミトコンドリア分画にもっとも多く、以下ライソゾーム、ミクロゾーム、可溶性分画の順であったと述べている。蛍光抗体法を用いて組織学的に検討したNakagawaら³⁾の観察では、塗布されたDNCBは真皮には証明されずに、表皮細胞の細胞膜を含めた胞体に一致して観察され、今回の遊離表皮細胞の蛍光抗体法による検討でも同様の所見であった。以上の成績はDNCBは表皮成分と結合し易く、その細胞膜や胞体成分と結合することを示すが、細胞膜と結合している確実な証拠はない。そこで我々は免疫走査電顕、酵素抗体法を行い、DNCBが細胞膜表面に結合していることを確認した。そうすると表皮細胞の細胞膜のどのような成分と結合しているかという問題が続いて生じてくるが、それに関する検討の報告はない。Formanら¹⁶⁾は*in vitro*で、trinitrophenol (TNP) 化した脾細胞は1細胞あたり 9×10^6 コのTNP基をもち、細胞膜の主要組織適合抗原(MHC) H-2分子(D+K)の68—95%にTNPが結合していたと報告し、表皮細胞においても同様にMHCと結合している可能性が考えられる。Tamakiら¹⁷⁾はtrinitrochlorobenzene (TNCB)でアレルギー性接触過敏性を成立させたマウスにTNP化表皮細胞を障害させるcytotoxic effector cellが産生されていることを報告し、これらのT cellが反応する抗原決定基はH-2のKまたはD領域の産物のハプテンにより生じ

たaltered self antigenであるとする考えが発表されている。

表皮細胞は角化細胞、ランゲルハンス細胞、色素細胞から成るが、電顕的に角化細胞表面にDNP基が分布することを証明したが、最近とみにその役割が注目されているランゲルハンス細胞については確認は不成功であった。そこで蛍光抗体法により証明されたIa陽性細胞のDNPの分布を酵素抗体法で検討したところそれが確認された。Shellyら¹⁸⁾は*in vitro*で表皮ランゲルハンス細胞は化学物質と結合しやすいことを報告しているが、*in vivo*でのハプテンとの結合の報告は見当たらない。

次に細胞膜表面にDNP基を証明した遊離表皮細胞(DNP-EC)が実際にアレルギー性接触皮膚炎の感作を成立させる能力があるかどうかを検討した。DNP-EC 5×10^6 コ以上を同系JY-1モルモットの耳介皮内に注射すると感作は容易に成立し、DNP-ECを超音波で破壊しても、それを更に56°C 30分間加熱しても抗原性は変わらなかったが、凍結・融解を繰り返すと感作率は著しく低下した。これらの成績は形成されたDNP-表皮細胞結合物がアレルギー性接触皮膚炎の抗原であることを示している。Ptakら¹⁹⁾、Tamakiら²⁰⁾、池沢ら²¹⁾が示しているように*in vitro*で遊離表皮細胞をTNP化しそれでアレルギー性接触過敏症の感作を成立させる実験は一般化しているが、*in vivo*で形成された結合物による感作は西岡ら²²⁾の報告のみである。凍結・融解により抗原性が消失したことはDNP-EC中の中に未結合のDNCBが残在し、それにより感作が成立する可能性を否定する根拠の1つと考える。凍結・融解により担体蛋白が著しく変性に陥ったために感作が誘導できなかったのである。56°C 30分の加熱では成立したが以前*in vitro*でDNP化したリンパ節細胞では同様の処置で感作能力が消失している²³⁾。

近年ランゲルハンス細胞はマクロファージと同様の性質、機能を有することが証明され^{4), 5)}、それとともにアレルギー性接触皮膚炎における、その役割が証明されるようになった。マウ

スの本来、同細胞の密度の小さい尾部や紫外線などで人為的に同細胞に障害を与えた皮膚にハプテンを投与すると感作の成立は困難であり、そういう動物ではトレランスが成立することが報告され、同細胞が感作過程で重要な役割を果たしていることが示唆されている⁶⁾。そして遅延型過敏症におけるマクロファージと同様ランゲルハンス細胞も免疫担当細胞に抗原を提示するものと推測されている⁴⁾。tape stripping した皮膚に DNP-EC を皮内注射すると感作率は明らかに減じ、DNP-EC を正常の EC あるいは腹腔マクロファージとともに投与すると再び十分な感作が成立するという今回の成績はランゲルハンス細胞はマクロファージと同様アレルギー性接触皮膚炎の抗原を phagocyte, process し免疫適合細胞に present することを示す。一部で考えられているランゲルハンス細胞の Ia 抗原にハプテンが結合して not self となり、それが直接免疫適合細胞に present される可能性は薄く、少なくともハプテンが結合するのと、抗原提示するのは別の細胞によるものと思われる。また tape stripping が感作成立に影響を与えるのは抗原の投与前後3日間で、7日前後ではそれがみられなかった。Les-

sard ら²⁴⁾ は tape stripping 後3日目では新生表皮において ATPase 陽性細胞が約 28% (248/946) に減少し、6日後 50% (413/812)、10日後 68% (624/768)、15日後 90% (836/920) と回復していったとしているが、我々の実験で影響が著しい3日間はランゲルハンス細胞の障害が特に著しい時期と言える。

DNP-EC 投与を同時 (0d) と3日後 (+3d) に tape stripping した部位では tolerance が誘導されたが、3日前の stripping では誘導されていない。また DNP-EC を正常 EC 3×10^6 コ加えた動物では tolerance が誘導されているが、 3×10^6 コでは誘導されなくなっている。これらの結果は tolerance を起こさなくするランゲルハンス細胞の数即ちトレランスのスイッチを切る数は感作に必要な数より少ないと考えられる。我々の成績もランゲルハンス細胞の関与がない場合トレランスが誘導されることを示している。

稿を終わるに当たり、 T_4 -anti-rabbit IgG を供与くださった岡山大学泌尿器科教室公文裕己先生に深謝するとともに、御指導、御校閲を賜った植木宏明教授、並びに終始御指導下さいました中川昌次郎助教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Frey, J. R. und Geleick, H.: Sensibilisierungsweg und Sensibilisierungserfolg beim Kontaktekzem des Meerschweinchens durch Dinitrochlorobenzol. *Dermatologica* 124: 389—397, 1962
- 2) Frey, J. R. und Geleick, H.: Intranodale (intralymphatische) Injektion von Dinitrochlorobenzol und kontaktekzem des Meerschweinchens. *Dermatologica* 124: 321—325, 1962
- 3) Nakagawa, S., Ueki, H. and Tanioku, K.: The distribution of 2,4-dinitrophenyl groups in guinea pig skin following surface application of 2,4-dinitrochlorobenzene: An immunofluorescent study. *J. invest. Dermatol.* 57: 269—277, 1971
- 4) Stingl, G., Katz, S. I., Clement, L., Green, I. and Shevach, E. M.: Immunological functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 121: 2005—2013, 1978
- 5) Thorbecke, G. J., Silberberg-Sinakin, I. and Flotte, T. J.: Langerhans cells as macrophages in skin and lymphoid organs. *J. invest. Dermatol.* 75: 32—43, 1980
- 6) Toews, G. B., Bergstressor, P. B., Streinlein, J. W. and Sullivan, S.: Epidermal Langerhans cells density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* 124: 445—453, 1980
- 7) Horio, T. and Okamoto, H.: Immunological unresponsiveness induced by topical application of hapten to PUVA-treated skin in guinea pigs. *J. invest. Dermatol.* 80: 90—93, 1983

- 8) Eisen, H. N., Gray, W., Russell, J. and Simms, E. S.: Purification of antibodies to the 2,4-dinitrophenyl (DNP) groups and to the 2, 4, 6-trinitrophenyl (TNP) groups. *In Methods in immunology and immunochemistry*, Vol. 1. New York and London, Academic Press Inc. 1967, pp. 355—360
- 9) Geczy, A. F., de Weck, A. L. Schwartz, B. D. and Shevach, E. M.: The major histocompatibility complex of the guinea pig. I. Serologic and genetic studies. *J. Immunol.* 115: 1704—1710, 1975
- 10) Steinmuller, D. and Wunderlich, J. R.: The use of freshly explanted mouse epidermal cells for the *in vitro* induction and detection of cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol.* 24: 146—163, 1976
- 11) Frey, J. R., de Weck, A. L. and Geleick, H.: Immunological unresponsiveness in allergic contact dermatitis to dinitrochlorobenzene in guinea pigs. *J. invest. Dermatol.* 42: 41—47, 1964
- 12) De Weck, A. L., Frey, J. R. and Geleick, H.: Specific inhibition of contact dermatitis to dinitrochlorobenzene in guinea pigs by injection of hapten and protein conjugates. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 24: 63—87, 1964
- 13) Eisen, H. N., Orris, L. and Belman, S.: Elicitation of delayed allergic skin reactions with haptens. The dependence of elicitation on hapten combination with protein. *J. exp. Med.* 95: 473—487, 1952
- 14) Eisen, H. N. and Tabachnick, M.: Elicitation of allergic contact dermatitis in the guinea pig: The distribution of bound dinitrobenzene groups within the skin and quantitative determination of the extent of combination of 2,4-dinitrochlorobenzene with epidermal protein *in vivo*. *J. exp. Med.* 108: 773—796, 1958
- 15) Nishioka, K. and Amos, H. E.: Contact sensitivity *in vitro*. The production of macrophage inhibition factors from DNCB sensitized lymphocytes by subcellular organelles obtained from DNCB epidermal tissue. *Immunology* 25: 423—432, 1973
- 16) Forman, J., Vitetta, E. S., Hart, D. A. and Klein, J.: Relationship between trinitrophenyl and H-2 antigens on trinitrophenyl-modified spleen cell. I. H-2 antigen on cells treated with trinitrobenzene sulfonic acid are derived. *J. Immunol.* 118: 797—802, 1977
- 17) Tamaki, K., Fujiwara, H., Leyv, R. B., Shearer, G. M. and Katz, S. I.: Hapten specific TNP-reactive cytotoxic effector cells using epidermal cells as targets. *J. invest. Dermatol.* 77: 225—229, 1981
- 18) Shelley, W. B. and Juhlin, L.: Langerhans cells form a reticuloepithelial trap for external contact allergens. *Nature* 261: 46—47, 1976
- 19) Ptak, W., Rozycka, D., Askenase, P. W. and Gershon, R. K.: Role of antigen-presenting cells in the development and persistence of contact hypersensitivity. *J. exp. Med.* 151: 362—375, 1980
- 20) Tamaki, K., Fujiwara, H. and Katz, S. I.: The role of epidermal cells in the induction and suppression of contact sensitivity. *J. invest. Dermatol.* 76: 275—278, 1981
- 21) 池沢善郎, 佐藤政博, 永井隆吉, 奥田研爾: TNP 結合 epidermal cell および spleen cell による TNCB 接触過敏症の誘導—接触過敏症の誘導におけるハプテン結合細胞表面 Ia 抗原の役割—。日皮会誌 91: 729—737, 1981
- 22) Nishioka, K., Aoki, T. and Tashiro, M.: Studies on carrier substance in DNCB contact allergy. *Dermatologica* 142: 232—240, 1971

- 23) Nakagawa, S., Aoshima, T., Mimura, S., Gotoh, M. and Ueki, H.: Induction of contact sensitivity to DNCB with *in vitro* dinitrophenylated lymph node cells. *Dermatologica* 161:8—11, 1980
- 24) Lessard, R. J., Wolff, K. and Winkelmann, R. K.: The disappearance and regeneration of Langerhans cells following epidermal injury. *J. invest. Dermatol.* 50:171—179, 1968